

PRIORITY DOCUMENT**INPI**
INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE14 FEB 1996
WIPO PCT

08/860231

BREVET D'INVENTION**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION****COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 17 FEB 1996

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef de Division

Yves CAMPENON

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLESIEGE
26 bis. rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cedex 08
Téléphone : (1) 42 94 52 52
Télécopie : (1) 42 93 59 30



REQUETE

EN DÉLIVRANCE D'UN
TITRE DE PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE *

DATE DE REMISE DES PIÈCES 29 JAN. 1995
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 95 00327 -
CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT 29

a	<input checked="" type="checkbox"/> BREVET D'INVENTION
b	<input type="checkbox"/> CERTIFICAT D'UTILITÉ
c	<input type="checkbox"/> DEMANDE D'INNOVATION
d	<input type="checkbox"/> TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN

Pour a et d, précisez : Nature, N° et date de la
demande initiale

2 OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)

LE DEMANDEUR REQUIERT L'ÉTABLISSEMENT DIFFÈRE DU RAPPORT DE RECHERCHE	<input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	SI L'OPTION CHOISIE EST NON ET SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE PHYSIQUE IL REQUIERT LE PAIEMENT ÉCHELONNÉ DE LA REDEVANCE DE RAPPORT DE RECHERCHE	<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON
---	---	---	--

NATURE NUMERO DATE DE LA DEMANDE INITIALE

3 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI TOUTE LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet GERMAIN & MAUREAU

B.P. 3011

69392 LYON CEDEX 03

5 RÉFÉRENCE DU CORRESPONDANT

MD/MK/T 12 B 2107 FR

6 TÉLÉPHONE DU CORRESPONDANT

72 60 28 90

7 TITRE DE L'INVENTION

Milieu nutritif utilisable comme milieu de culture de cellules épidermiques
et applications pharmaceutiques

8 DEMANDEUR(S) : Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

N° SIREN

1) THOREL Jean-Noël

2) SARL dite : SOCIÉTÉ D'EXPLOITATION FRANÇAISE DES RECHERCHES BIODERMA

9 ADRESSE(S) COMPLÈTE(S)

1) 3 rue de la Rochelle - 75014 PARIS

2) ZAC Pichaury II 6 Rue Pierre Berthier
13290 LES MILLES

PAYS

FRANCE

FRANCE

10 NATIONALITÉ(S)

1) et 2) Françaises

11 INVENTEUR(S)

LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE
INVENTEUR☐ OUI

Si la réponse est non voir notice explicative

☒ NON

12

SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE
PHYSIQUE NON IMPOSABLE, IL
REQUIERT QU'IL A RECUS LA RÉDUCTION
DES REDEVANCES☐ OUI☐ NON☒ DE DÉPÔT

REDEVANCES VERSÉES

☐ DE RAPPORT DE RECHERCHE☐ DE REVENDICATION DE PRIORITÉ☐ DE REVENDICATION (à partir de la 11e)

13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTÉRIEURE

PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMERO

14

DIVISIONS

ANTÉRIEURES À LA
PRÉSENTE DEMANDE

N°

N°

N°

N°

15 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
NOM ET QUALITÉ DU SIGNATAIRE N° D'INSCRIPTIONDominique GUERRE
CPI 921104

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

D. GIRAUD

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI



26bis, rue de Saint-Petersbourg 75800 Paris Cédex 08 Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

Division Administrative des Brevets

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° d'enregistrement national

9500327

Titre de l'invention :

Milieu nutritif utilisable comme milieu de culture de cellules épidermiques et applications pharmaceutiques

Le (s) soussigné (s)

Cabinet GERMAIN & MAUREAU
B.P. 3011
69392 LYON CEDEX 03
FRANCE

désigne (nt) en tant qu'inventeur (s) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

THOREL Jean-Noël
3 rue de la Rochelle
75014 PARIS

GATTO Hugues
15 rue Pasteur
73200 ALBERTVILLE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

le 9 janvier 1995

Dominique GUERRE
CPI 921104

- sous forme émulsionnée, étant entendu que la force ionique de la phase discontinue implique l'instabilité de l'émulsion ; il est cependant possible de formuler des phases lamellaire ou cylindrique présentant une meilleure stabilité, ou encore un système bi-phasique remis extemporanément en émulsion par simple agitation;

- par encapsulation :

* dans une capsule rigide, du type polysaccharide, dispersée dans la phase lipidique,

10 * dans une capsule molle, du type gélatine, dispersée dans la phase discontinue.

L'utilisation de liposomes comme vecteur d'encapsulation est envisageable sous forme d'un gel liposomal en phase continue aqueuse.

15 Une composition selon l'invention peut servir de base galénique, notamment nutritive. Son apport nutritionnel est notablement intéressant pour l'amélioration de la viabilité, le maintien de l'intégrité et l'équilibre des cellules cutanées superficielles.

20 De manière plus générale, une composition selon l'invention peut être incorporée dans toute préparation à usage galénique, en tant que principe actif avec éventuellement d'autres principes actifs, mais également comme excipient grâce à sa capacité à potentialiser 25 l'action de principes actifs spécifiques.

Un milieu nutritif complexe selon l'invention recrée un environnement extra-cellulaire adapté, en fournissant :

- un apport nutritionnel optimisé, aussi bien en 30 vitamines, oligo-éléments, qu'en acides aminés essentiels,
- des facteurs de croissance cellulaire, visant à substituer les interactions cellulaires morphogènes,
- et des caractéristiques de pH et d'osmolarité proches des conditions physiologiques.

35 Dans un médicament selon la présente invention, la phase biocompatible dans laquelle est distribué l'agent

nutritionnel peut constituer l'excipient, ou l'un des composants de l'excipient dudit médicament.

Ou encore, dans un médicament selon l'invention, l'agent nutritionnel ou milieu nutritif complexe peut
5 constituer le principe actif, ou au moins l'un des principes actifs dudit médicament, ou servir d'agent de potentialisation de l'action de principes actifs spécifiques.

Les caractéristiques, applications et avantages de
10 la présente invention sont exposés plus en détails dans les Exemples 1 et 2 et les figures 1 à 3 suivants.

L'Exemple 1 donne un exemple de formulation d'une composition de l'invention.

L'Exemple 2 met en évidence les propriétés d'une
15 composition de l'invention par rapport à des milieux connus, à l'appui du dessin annexé dans lequel :

Fig 1 est une vue en coupe d'épidermes humains après 36 heures de culture dans un milieu commercial standard dénommé MCDB 153, commercialisé notamment par
20 IRVINE SCIENTIFIC,

Fig 2 est une vue en coupe d'épidermes humains après 36 heures de culture dans une solution saline tamponnée (PBS), solution saline équilibrée couramment utilisée en culture cellulaire, et

25 Fig 3 est une vue en coupe d'épidermes humains en culture dans le milieu nutritif de l'invention, décrit à l'Exemple 1 à différents temps de culture :

30 A : au bout de 12 heures
B : au bout de 24 heures
C : au bout de 36 heures

Exemple 1:

Formulation d'une composition de l'invention

TABLEAU 1

COMPOSANTS	Concentration en mg/l.
Acides aminés	
L-Alanine	9,2
L-Arginine HCL	421,4
L-Asparagine (anhydre)	14,2
Acide L-aspartique	4,0
L-Cystéine HCL. H ₂ O	42,0
Acide L-Glutamique	14,8
L-Glutamine	1754,4
Glycine	7,6
L-Histidine HCL. H ₂ O	50,0
L-Isoleucine	6,0
L-Leucine	131,2
L-Lysine HCL	54,0
L-Méthionine	13,5
L-Phénylalanine	10,0
L-Proline	34,6
L-Sérine	126,1
L-Thréonine	24,0
L-Tryptophane	9,3
L-Tyrosine 2 Na 2H ₂ O	11,7
L-Valine	70,3
Vitamines et facteurs de croissance cellulaire	
d-Biotine	0,02
Acide folique	0,80
Nicotinamide	0,04
D-Ca Pantothénate	0,30
Pyridoxine HCL	0,06
Riboflavine	0,04
Thiamine HCL	0,30
Vitamine B ₁₂	0,41
i-Inositol	18,0

Putrescine 2 HCl	0,20
Pyruvate de sodium	55,0
Thymidine	0,73
Adénine (HCl)	24,0
Acide DL-lipoïque	0,20

Composants inorganiques

Chlorure de sodium	6800,0
KCl	112,0
Na ₂ HPO ₄	284,0
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,003
Acétate de sodium	300,0 (anhydre)
D-Glucose	1080,0
HEPES (pipérazine)	6600,0
Phosphoryléthanolamine	0,06768
Ethanolamine	0,04684
Sulfate de sodium	3,4
Bicarbonate de sodium	1160,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,39
MgCl ₂ .6H ₂ O	120,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	de 13,0 à 22,05
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,144
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,00120
Na ₂ SiO ₃ .5H ₂ O	0,142
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,00002
SnCl ₂ .2H ₂ O	0,00011
NH ₄ VO ₃	0,00057

Exemple 2:

La cytocompatibilité et les performances du milieu nutritif complexe décrit à l'Exemple 1 ont été testées sur
 5 des cultures de kératinocytes humains en monocouche, et sur des épidermes humains reconstitués in vitro.

Le milieu nutritif selon l'Exemple 1 permet la culture de kératinocytes en monocouche dans des conditions

optimales de viabilité, durant au moins 36 heures, sans que ne se manifeste le moindre effet cytotoxique.

A l'inverse, une solution de survie classique telle que le PBS (Phosphate Buffered Saline, solution saline équilibrée couramment utilisée en culture cellulaire) s'avère cytotoxique dès 12 heures d'incubation.

Conformément à la Fig 3, Le milieu nutritif selon l'exemple autorise une culture d'épidermes humains normaux reconstitués dans des conditions optimales de viabilité, sans manifestations cytotoxiques même après 36 heures (Fig 3C) de mise en contact. Les cultures présentaient des couches cellulaires basales, spineuses, granuleuses et cornées intactes, orthokératosiques, de stratification régulière et normale.

En comparant la Fig 3C avec la Fig 1, cette dernière illustrant l'utilisation d'un milieu commercial standard (MCDB 153, commercialisé notamment par IRVINE SCIENTIFIC), on voit que les performances du milieu de l'invention sont aussi bonnes.

Par contre, l'utilisation de PBS induit, conformément à Fig 2, l'apparition de kératinocytes en phase terminale de différenciation au niveau des assises basales et spineuses, avec des signes de nécrose plus ou moins prononcés. On note également un décollement total de l'épiderme, avec destructuration complète des différentes assises kératinocytaires.

REVENDECATIONS

1/ Utilisation pour l'obtention d'un médicament d'une composition à usage topique, comprenant une phase biocompatible avec les parties superficielles du corps humain, dans laquelle est distribué de manière homogène un agent nutritionnel desdites parties superficielles, consistant en un milieu nutritif complexe, comprenant des composés à la fois biocompatibles, bio-mimétiques et biodisponibles au niveau cutané, à l'exclusion de tout extrait biologique d'origine animale, ledit milieu nutritif complexe ayant une composition adaptée pour permettre, en dehors de la phase dans laquelle ledit milieu est distribué, une culture viable in vitro d'un inoculum de kératinocytes épidermiques humains, avec au moins une prolifération clonale de ces derniers au premier passage.

2/ Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le milieu nutritif complexe comprend des acides aminés, au moins une vitamine, au moins un facteur de croissance cellulaire, et au moins un sel minéral.

3/ Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le milieu nutritif complexe a la composition suivante, la concentration des composants étant exprimée en mg/l :

Acides aminés

L-Alanine	9,2
L-Arginine HCL	421,4
L-Asparagine (anhydre)	14,2
Acide L-aspartique	4,0
L-Cystéine HCL. H ₂ O	42,0
Acide L-Glutamique	14,8
L-Glutamine	1754,4
Glycine	7,6
L-Histidine HCL. H ₂ O	50,0

L-Isoleucine	6,0
L-Leucine	131,2
L-Lysine HCl	54,0
L-Méthionine	13,5
L-Phénylalanine	10,0
L-Proline	34,6
L-Sérine	126,1
L-Thréonine	24,0
L-Tryptophane	9,3
L-Tyrosine 2 Na 2H ₂ O	11,7
L-Valine	70,3

Vitamines et facteurs de croissance cellulaire

d-Biotine	0,02
Acide folique	0,80
Nicotinamide	0,04
D-Ca Pantothénate	0,30
Pyridoxine HCl	0,06
Riboflavine	0,04
Thiamine HCl	0,30
Vitamine B ₁₂	0,41
i-Inositol	18,0
Putrescine 2 HCl	0,20
Pyruvate de sodium	55,0
Thymidine	0,73
Adénine (HCl)	24,0
Acide DL-lipoïque	0,20

Composants inorganiques

Chlorure de sodium	6800,0
KCl	112,0
Na ₂ HPO ₄	284,0
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,003
Acétate de sodium	300,0 (anhydre)
D-Glucose	1080,0
HEPES (pipérazine)	6600,0

Phosphoryléthanolamine	0,06768
Ethanolamine	0,04684
Sulfate de sodium	3,4
Bicarbonate de sodium	1160,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,39
MgCl ₂ .6H ₂ O	120,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	de 13,0 à 22,05
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,144
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,00120
Na ₂ SiO ₃ .5H ₂ O	0,142
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,00002
SnCl ₂ .2H ₂ O	0,00011
NH ₄ VO ₃	0,00057

4/ Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la composition est sous forme biphasique, avec une phase continue aqueuse contenant le milieu nutritif complexe, et notamment sous forme de gel aqueux, ou d'émulsion d'huile dans l'eau.

5 5/ Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la composition est sous forme biphasique, avec une phase continue huileuse, notamment sous forme d'émulsion, la phase discontinue contenant le milieu nutritif complexe.

6/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la phase biocompatible dans laquelle est distribué l'agent nutritionnel constitue l'excipient.

15 7/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'agent nutritionnel constitue l'un des, sinon le principe actif dudit médicament.

20 8/ Base galénique comprenant une phase biocompatible avec les parties superficielles du corps humain, dans laquelle est distribué de manière homogène un agent nutritionnel desdites parties superficielles, caractérisée en ce que l'agent nutritionnel consiste en un

milieu nutritif complexe, comprenant des composés à la fois biocompatibles, bio-mimétiques et biodisponibles au niveau cutané, à l'exclusion de tout extrait biologique d'origine animale, ledit milieu nutritif complexe ayant
5 une composition adaptée pour permettre, en dehors de la phase dans laquelle ledit milieu est distribué, une culture viable in vitro d'un inoculum de kératinocytes épidermiques humains, avec au moins une prolifération clonale de ces derniers au premier passage.

1/2

FIG 1



FIG 2

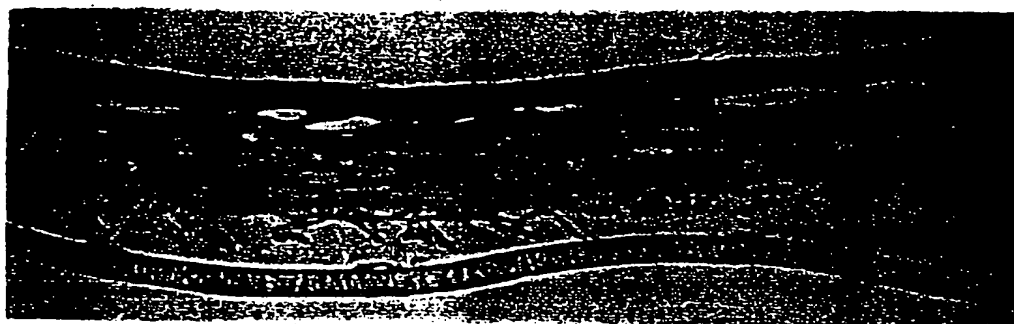


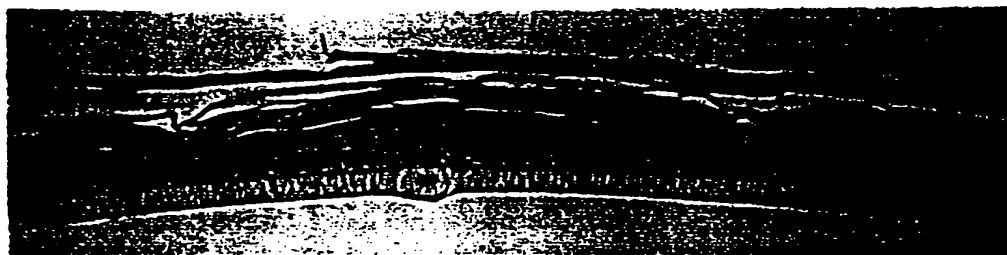
FIG 3



A



B



C